

小脑浦肯野细胞动作电位传输保真度 在大鼠出生后发育期间的变化^{*}

杨志来^{1, 2)} 王晋辉^{1, 2)**}

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所, 脑与认知科学国家重点实验室, 北京 100101; ²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 小脑浦肯野细胞的轴突是小脑皮层唯一的传出通路, 研究其动作电位传输能力对于了解小脑的生理功能具有重要意义. 大鼠在出生后第 2 周到第 3 周, 小脑浦肯野细胞的形态及功能都有显著变化, 产生动作电位的能力明显增强. 而轴突上动作电位传输能力的变化还有待研究. 运用胞体以及轴突的双电极膜片钳技术, 研究了出生 8 天以及 15 天的 Wistar 大鼠小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输. 与 8 天组相比, 15 天组大鼠小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输能力明显增强. 后超极化可以增强 8 天组轴突上动作电位的传输能力. 研究表明, 随着发育的成熟, 动作电位的产生能力以及轴突上动作电位的传输能力同步增强.

关键词 小脑浦肯野细胞, 动作电位, 传输, 电压门控钠通道, 轴突

学科分类号 Q421, Q424

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00095

轴突作为神经元的重要组成部分, 在神经系统信号处理过程中发挥了重要作用, 主要包括动作电位的起始^[1-3]、动作电位的放大^[4-5]以及将动作电位传输到轴突末端^[6-8]等. 神经元之间通过突触联系实现神经信息的快速交流. 这一过程依赖于动作电位从起始点传输到轴突末端. 轴突上动作电位的传输失败会影响动作电位编码的有效性. 因此, 对轴突传输功能的研究有利于我们认识神经信息在神经细胞内以及神经细胞之间的传递, 从而有利于揭示整个神经网络的功能.

早期研究者认为动作电位可以沿着轴突安全地传输到轴突末端, 最近这个观点受到了挑战^[9-13]. 轴突上动作电位的传输失败主要是出现在高频发放的神经元, 例如动物小脑浦肯野细胞, 其发放频率可以高达 500 Hz^[14]. 在体(*in vivo*)实验显示小脑浦肯野细胞可以发放高频动作电位, 并且发放时间可以长达数秒^[15]. 小脑浦肯野细胞的轴突是小脑皮层唯一的传出通路, 对于其传输的研究具有重要的理论及现实意义. 因此, 我们选择在动物小脑浦肯野细胞中研究动作电位的传输及其机理.

动作电位的传输能力在动物出生后发育过程中

是否改变, 现在还不明确. Wistar 大鼠出生后第 2 周到第 3 周, 其小脑浦肯野细胞在形态上以及功能上都有显著变化, 产生动作电位的能力明显增强^[16]. 在胞体附近产生的动作电位只有传输到轴突末端, 引起突触反应, 才能有效地调控突触后细胞的功能状态, 那么当动作电位的产生能力有了很大的增强时, 小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输能力是否也相应地增强呢? 只有在轴突上动作电位的传输能力增强的情况下, 胞体附近产生的动作电位才是有效的神经编码信息, 而不会造成能量的浪费. 为了研究轴突的传输能力, 我们定义了动作电位传输保真度(fidelity), 即轴突上记录到的动作电位数 / 胞体记录到的动作电位数. 动作电位的传输保真度可以反映轴突上动作电位的传输能力. 即动作电位的传输保真度越大, 轴突上动作电位的

^{*} 国家重点基础研究发展计划(973)(2013CB531304, 2011CB504405)和国家自然科学基金(30990261, 81171033)资助项目.

^{**} 通讯联系人.

Tel: 010-64888472, E-mail: jhw@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-03-15, 接受日期: 2013-04-24

传输能力越强; 反之动作电位的传输保真度越小, 轴突上动作电位的传输能力越弱. 本研究通过胞体以及轴突断端的双电极膜片钳记录, 希望阐明在大鼠出生后 2~3 周的发育过程中小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输能力是否变化以及出现变化的机理.

1 材料与方法

1.1 小脑切片及切片后脑片的孵育

出生后 8 天(PND8)以及出生后 15 天(PND15)的 Wistar 大鼠(雌雄不限)购自中国科学院生物物理研究所动物房. 动物的使用以及实验方案得到中国科学院生物物理研究所实验动物管理及伦理委员会的批准. Wistar 大鼠经麻醉后, 快速断头并取出小脑置于冰冻的切片液内(mmol/L: 124 NaCl, 3 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 5 MgSO₄, 10 dextrose 和 5 HEPES; pH 7.4), 切片液持续通氧(95%氧气+5%CO₂)并保持低温(放在冰上). 大鼠小脑组织切下后, 按实验要求将组织块修整合适, 黏连到振动切片机上, 对小脑进行矢状切片(Sagittal slices), 切片厚度为 350~400 μ m. 脑片切完后, 首先将脑片置于人工脑脊液(mmol/L: 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄ 和 25 dextrose; pH 7.4)中, 在 35℃ 培养 30 min, 然后将脑片转移至常温(28℃~32℃)下培养. 灌流液(人工脑脊液)持续通氧, 培养时间不少于 1 h.

1.2 实验记录过程

将脑片转移至操作台的记录槽内, 记录槽内保证灌流液常温, 灌流液保持持续流动并且通氧, 流

速约为 2~3 ml/min. 以尼龙网将脑片固定, 镜下观察小脑浦肯野细胞的状态以及轴突完整程度. 在本实验中, 只选择轴突长度较长的小脑浦肯野细胞进行记录, 这样可以降低胞体信号对轴突信号的影响. 首先对小脑浦肯野细胞的胞体进行全细胞记录(电极电阻 5~10 M Ω , 内含有 5~10 μ mol/L 的 Alex488). 电极内液为: (mmol/L: 150 K-gluconate, 5 NaCl, 0.4 EGTA, 4 Mg-ATP, 0.5 Tris-GTP, 4 Na-phosphocreatine 和 10 HEPES pH 7.4). 全细胞膜片钳形成后, 等待 10~20 min, 荧光染料(Alex488)就可以扩散到轴突, 在荧光显微镜下可以看到轴突的走向以及形态. 然后对轴突断端进行松散式膜片钳记录. 松散式膜片钳记录的电极内液为灌流液. 通过胞体以及轴突上的双电极膜片钳记录, 可以分析轴突上动作电位的传输保真度.

1.3 数据采集及分析

数据采集运用 clamex 10 软件, 数据分析运用 clampfit 10 软件. 当动作电位发放频率为 100、150 以及 200 Hz 时, 分析了全部相同时间(0.1 s)的动作电位的传输保真度. 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 图 4e 以及图 4f 运用配对 *t* 检验进行分析, 其他运用独立样本 *t* 检验进行分析, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, NS 表示 *P* > 0.05.

2 结 果

2.1 动作电位传输保真度的测量

在本实验中, 运用动作电位的传输保真度来表示轴突上动作电位的传输能力. 如图 1a 所示, 对胞体进行全细胞膜片钳记录, 同时对轴突断端进行松散式膜片钳记录. 当给予胞体去极化脉冲刺激

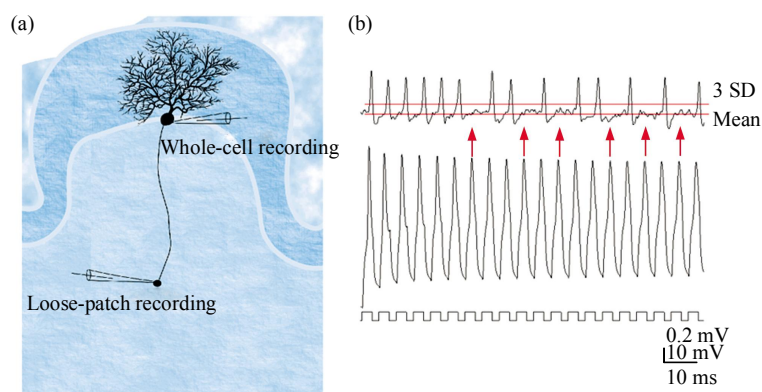


Fig. 1 The diagram of our experiment

(a) Double-patch recordings on the soma and the axonal bleb. The Purkinje cell is drawn in coredraw. (b) A diagram of spike propagation failure. Red lines show mean and 3 SD of axonal noise signal. Red arrows indicate the failure of spike propagation. Calibration bars are 0.2 mV for axonal signals, 10 mV for somatic signals and 10 ms for time.

时,在胞体可以记录到动作电位串,同时在轴突也可以记录到小动作电位信号.当轴突信号大于噪音信号的平均值+3倍标准差时(图1b所示红线),我们认为轴突的信号为有效信号,即对应的动作电位在轴突上安全传输;当轴突信号小于噪音信号的平均值+3倍标准差时,认为对应的动作电位在轴突上传输失败.动作电位传输保真度=轴突记录到的动作电位数/胞体记录到的动作电位数.

2.2 大鼠出生 8 天组小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输能力

根据 Wistar 大鼠出生后的天数,把本研究分成 8 天组以及 15 天组.首先研究了 8 天组小脑浦

肯野细胞轴突上动作电位的传输能力.如图 2 所示,当动作电位的发放频率为 100 Hz 时,所有的动作电位都可以安全地传输;当动作电位的发放频率为 150 Hz 时,有个别的动作电位会出现传输失败(图 2b,箭头表示动作电位的传输失败);而当动作电位的发放频率为 200 Hz 时,会有较多的动作电位出现传输失败.统计结果(图 2d)显示,100、150 以及 200 Hz 时,动作电位的传输保真度分别为 (1 ± 0) , (0.94 ± 0.04) 以及 (0.59 ± 0.05) .8 天组的结果显示,小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输保真度具有频率依赖性.即动作电位发放频率越高,轴突上动作电位的传输保真度越低.

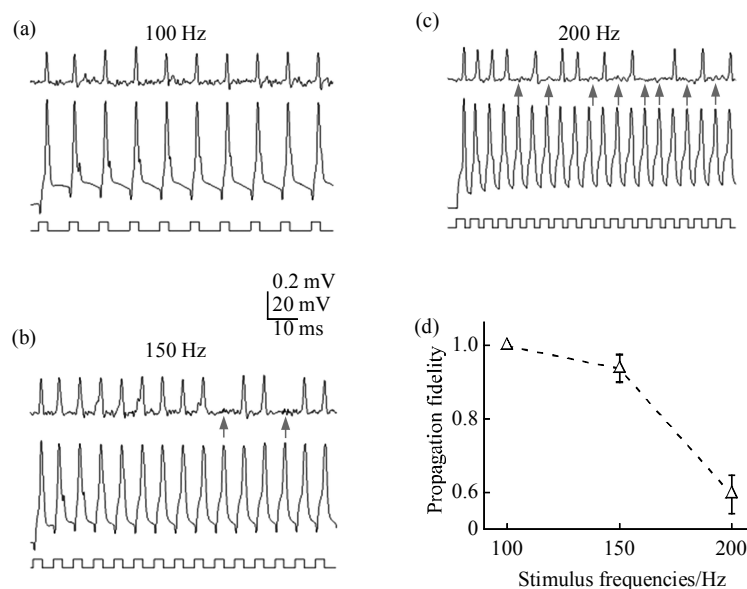


Fig. 2 The spike propagation fidelity in cerebellar Purkinje cells at PND 8

(a) The spike propagation at 100 Hz. The top trace is the axonal signals, and the middle trace is the somatic signals induced by depolarization pulses at 100 Hz (the bottom). (b) The spike propagation at 150 Hz. Arrows under the axonal signals show spike propagation failure. (c) The spike propagation at 200 Hz. (d) The spike propagation fidelity versus stimulus frequencies at PND 8. Δ — Δ : 8 Days.

2.3 大鼠出生 15 天组小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输能力

轴突上动作电位的传输能力在不同的发育阶段是否相同呢?我们进一步研究了出生后 15 天的 Wistar 大鼠轴突上动作电位的传输能力.如图 3 所示,在 100 Hz 以及 150 Hz 时,所有的动作电位都可以安全地传输;而在 200 Hz 时,会有个别动作电位出现传输失败.统计结果(图 3d)显示,动作电位发放频率为 100、150 以及 200 Hz 时,动作电位的传输保真度分别为 (1 ± 0) , (1 ± 0) 以及 (0.94 ± 0.05) .

通过与 8 天组相比较,发现 15 天组小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输保真度更高(图 3e, 200 Hz 时具有显著差异, $n=10$, $**P < 0.01$),即 15 天组轴突上动作电位的传输能力更强.因此,随着 Wistar 大鼠出生后发育的逐渐成熟,其小脑浦肯野细胞不仅动作电位的产生能力显著地增强^[6],轴突上动作电位的传输能力也显著地增强,从而保证了胞体附近产生的动作电位可以安全地传输到轴突末端,成为有效的神经编码信息.

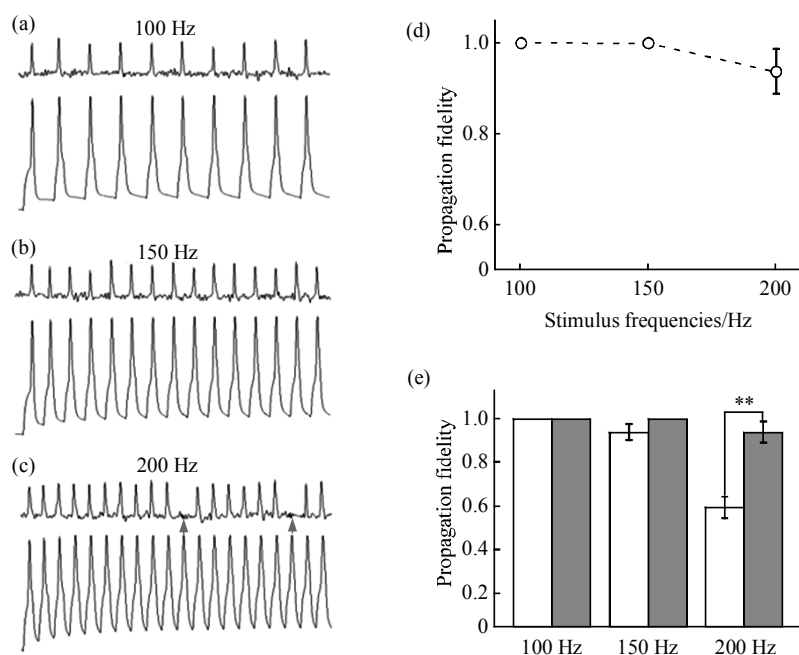


Fig. 3 The spike propagation fidelity in cerebellar Purkinje cells at PND 15

(a) The spike propagation at 100 Hz. The top trace is the axonal signals, and the bottom trace is the somatic signals induced by depolarization pulses at 100 Hz. (b) The spike propagation at 150 Hz. (c) The spike propagation at 200 Hz. Arrows under the axonal signals show spike propagation failure. (d) The spike propagation fidelity versus stimulus frequencies at PND 15. ○—○: 15 days. (e) The comparison of spike propagation fidelity at PND 8 and PND 15. The difference between the two groups is significant at 200 Hz. □: 8 Days; ■: 15 Days.

2.4 后超极化可以提高大鼠 8 天组小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输能力

上面的结果显示, 15 天组轴突上动作电位的传输保真度明显地高于 8 天组. 导致这一现象的机理是什么呢? 在本实验室以前的研究中发现, 动作电位的传输保真度与电压门控钠通道(VGSC)的活性密切相关, 即 VGSC 的活性越高, 轴突上动作电位的传输保真度越高. 后超极化可以增加电压门控钠通道的活性. 因此, 我们在每个动作电位之后加入后超极化, 观察能否提高轴突上动作电位的传输能力. 本实验中, 运用双向刺激脉冲(biphasic depolarization pulses, 即在每个去极化脉冲之后加一个超极化脉冲), 来研究后超极化对于动作电位传输保真度的影响. 把去极化脉冲(depolarization pulses, 图 2, 3)刺激时定义为对照组; 把双向刺激脉冲(biphasic depolarization pulses, 图 4)刺激时定义为 AHP 组. 如图 4 所示, 在出生后 8 天的 Wistar 大鼠中, 双向刺激脉冲的频率为 100 Hz 以

及 150 Hz 时, 所有的动作电位都可以安全地传输; 而在双向刺激脉冲的频率为 200 Hz 时, 会有个别的动作电位出现传输失败. 统计结果(图 4d)显示, 在后超极化组, 在 100, 150 以及 200 Hz 时, 8 天组动作电位的传输保真度分别为 (1 ± 0) , (1 ± 0) 以及 (0.96 ± 0.04) ; 而 15 天组动作电位的传输保真度分别为 (1 ± 0) , (1 ± 0) 以及 (1 ± 0) . 统计结果显示, 后超极化可以提高 8 天组轴突上动作电位的传输保真度(图 4e, 200 Hz 时, $**P < 0.01$, $n=10$), 但是不能提高 15 天组轴突上动作电位的传输保真度(图 4f, 200 Hz 时, NS, $P > 0.05$, $n=10$). 由于 15 天的 Wistar 大鼠轴突上动作电位的传输保真度在对照条件下已经很高, 加入后超极化后, 虽然保真度也有提高, 但是两者之间没有差异. 通过 8 天的 AHP 组与 15 天的对照组比较, 可以发现两者之间没有显著性差异(图 4g, $n=10$, $P > 0.05$). 即加入后超极化之后, 8 天的 Wistar 大鼠轴突上动作电位的传输能力提高到了 15 天 Wistar 大鼠对照条件下的水

平. 后超极化可以提高动作电位的传输能力, 我们推测发育过程中动作电位传输能力的变化可能是

VGSC 介导的, 还需要更多的实验来进一步地阐明这一推论.

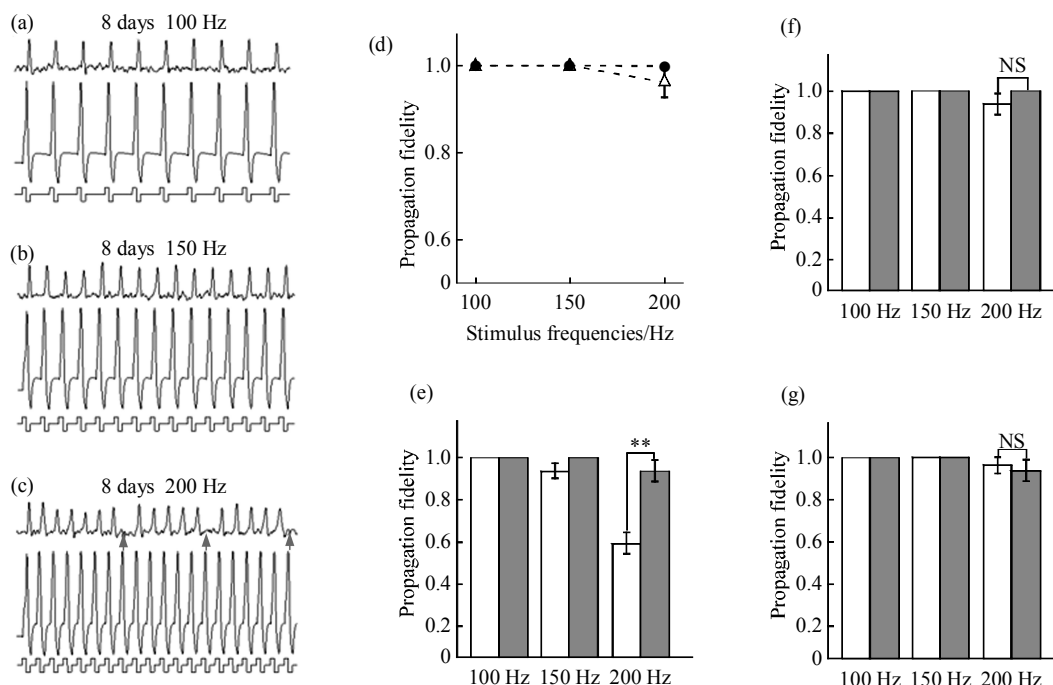


Fig. 4 Afterhyperpolarization can increase spike propagation fidelity at PND 8

(a) The spike propagation induced by 100 Hz biphasic depolarization pulses at PND 8. The top trace is the axonal signals, the middle trace is the somatic signals, and the bottom trace is the biphasic depolarization pulses. (b) The spike propagation induced by 150 Hz biphasic depolarization pulses at PND 8. (c) The spike propagation induced by 200 Hz biphasic depolarization pulses at PND 8. Arrows under the axonal signals show spike propagation failure. (d) The spike propagation fidelity versus stimulus frequencies in AHP groups. Δ — Δ : 8 days AHP; $\bullet$ — $\bullet$: 15 days AHP. (e) The comparison of spike propagation fidelity between Control group (depolarization pulses) and AHP group (biphasic depolarization pulses) at PND 8. $\square$: 8 Days control; $\blacksquare$: 8 Days AHP. (f) The comparison of spike propagation fidelity between Control group and AHP group at PND 15. $\square$: 15 Days control; $\blacksquare$: 15 Days AHP. (g) The comparison of spike propagation fidelity between AHP group at PND 8 and Control group at PND 15. $\square$: 8 Days AHP; $\blacksquare$: 15 Days control.

3 讨 论

本实验中我们研究了 Wistar 大鼠小脑浦肯野细胞轴突上动作电位的传输, 观察到轴突上动作电位的传输保真度在发育过程中的变化, 15 天组的动作电位传输保真度大于 8 天组的传输保真度. 通过在每个去极化脉冲之后加入一个超极化脉冲, 可以提高 8 天组的动作电位传输的保真度, 使其提高到 15 天组在对照条件下的水平. 本课题进一步验证了轴突上动作电位可能出现传输失败的观点^[11-12, 17-18], 并阐明了小脑浦肯野细胞在出生后发育过程中动作电位的产生能力与轴突上动作电位的传输能力同步增加.

在体(*in vivo*)记录到的神经元输入信号可以分为两类: 一类是持续的去极化(长方波形式), 另一类是波动式去极化(可以分解为去极化和超极化)^[9]. 持续的去极化使电压门控钠通道(VGSC)失活, 而超极化则提高了电压门控钠通道的活性. 根据我们的实验结果, 由波动式去极化产生的动作电位更容易传输到轴突末端. 这一结果说明轴突上动作电位的传输保真度受细胞膜电位以及输入信号模式的影响. 细胞以及突触的功能状态都可以影响到轴突上动作电位的传输, 从而进一步影响了神经信息的编码.

对于动作电位在轴突上是否会出现传输失败这一观点还存在争议. 通过细胞成像技术发现, 动作

电位可以安全地传输到轴突末端。例如, 钙成像技术发现胞体以及轴突末端都有钙信号, 证明了动作电位的安全传输。通过电压敏感染料成像发现, 发放频率小于 250 Hz 时, 小脑浦肯野细胞中动作电位可以安全传输^[20]。这些研究都是基于胞体发放一个或者少数几个动作电位时。我们的研究是根据浦肯野细胞的动作电位发放特点, 研究动作电位串的传输。如图 2c 以及图 3c 显示, 即使出现动作电位传输失败时, 前几个动作电位也可以安全地传输。因此, 我们的实验结果与上述实验并不冲突。

本实验室之前的研究结果显示, 动作电位的传输保真度受动作电位发放频率以及发放时间的影响。本实验中, 为了研究动作电位发放频率对于动作电位传输保真度的影响, 在不同刺激频率时, 分析了相同时间内的动作电位传输保真度, 这样会造成分析的动作电位的数目不同(详情见方法)。我们还分析了动作电位数目相同时, 轴突上动作电位的传输保真度(结果与本文结果类似, 未显示), 说明本实验结果不是由于动作电位的数目不同造成的。

本研究并没有深入地探讨动作电位传输保真度在发育过程中变化的机理。后超极化可以提高轴突上动作电位的传输保真度, 并且后超极化可以提高电压门控钠通道的活性^[21]。因此我们推测是由于电压门控钠通道的发育, 导致了轴突上动作电位传输保真度的变化。未来我们将进一步研究在动物出生后 2~3 周的发育过程中, 小脑浦肯野细胞中电压门控钠通道的类型以及数量是否会有所改变。从而揭示动作电位传输保真度在发育过程中变化的分子机理。

参 考 文 献

- [1] Stuart G, Schiller J, Sakmann B. Action potential initiation and propagation in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 1997, **505** (Pt 3): 617-632
- [2] Gullledge A T, Stuart G J. Action potential initiation and propagation in layer 5 pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex: absence of dopamine modulation. *J Neurosci*, 2003, **23**(36): 11363-11372
- [3] Clark B A, Monsivais P, Branco T, *et al.* The site of action potential initiation in cerebellar Purkinje neurons. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(2): 137-139
- [4] Engel D, Jonas P. Presynaptic action potential amplification by voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 2005, **45**(3): 405-417
- [5] Chen N, Yu J, Qian H, *et al.* Axons amplify somatic incomplete spikes into uniform amplitudes in mouse cortical pyramidal neurons. *PLoS One*, 2010, **5**(7): e11868
- [6] Kole M H, Stuart G J. Signal processing in the axon initial segment. *Neuron*, 2012, **73**(2): 235-247
- [7] Debanne D. Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci*, 2004, **5**(4): 304-316
- [8] Kress G J, Mennerick S. Action potential initiation and propagation: upstream influences on neurotransmission. *Neuroscience*, 2009, **158**(1): 211-222
- [9] Van Essen D C. The contribution of membrane hyperpolarization to adaptation and conduction block in sensory neurones of the leech. *J Physiol*, 1973, **230**(3): 509-534
- [10] Grossman Y, Parnas I, Spira M E. Mechanisms involved in differential conduction of potentials at high frequency in a branching axon. *J Physiol*, 1979, **295**: 307-322
- [11] Smith D O. Mechanisms of action potential propagation failure at sites of axon branching in the crayfish. *J Physiol*, 1980, **301**: 243-259
- [12] Meeks J P, Jiang X, Mennerick S. Action potential fidelity during normal and epileptiform activity in paired soma-axon recordings from rat hippocampus. *J Physiol*, 2005, **566**(Pt 2): 425-441
- [13] Meeks J P, Mennerick S. Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol*, 2007, **97**(5): 3460-3472
- [14] Maruta J, Hensbroek R A, Simpson J I. Intraburst and interburst signaling by climbing fibers. *J Neurosci*, 2007, **27**(42): 11263-11270
- [15] Loewenstein Y, Mahon S, Chadderton P, *et al.* Bistability of cerebellar Purkinje cells modulated by sensory stimulation. *Nat Neurosci*, 2005, **8**(2): 202-211
- [16] McKay B E, Turner R W. Physiological and morphological development of the rat cerebellar Purkinje cell. *The Journal of Physiology*, 2005, **567**(3): 829-850
- [17] Smith D O. Morphological aspects of the safety factor for action potential propagation at axon branch points in the crayfish. *J Physiol*, 1980, **301**: 261-269
- [18] Meeks J P, Mennerick S. Selective effects of potassium elevations on glutamate signaling and action potential conduction in hippocampus. *J Neurosci*, 2004, **24**(1): 197-206
- [19] Ge R, Qian H, Wang J H. Physiological synaptic signals initiate sequential spikes at soma of cortical pyramidal neurons. *Mol Brain*, 2011, **4**: 19
- [20] Foust A, Popovic M, Zecevic D, *et al.* Action potentials initiate in the axon initial segment and propagate through axon collaterals reliably in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*, 2010, **30**(20): 6891-6902
- [21] Chen N, Chen X, Yu J, *et al.* Afterhyperpolarization improves spike programming through lowering threshold potentials and refractory periods mediated by voltage-gated sodium channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **346**(3): 938-945

The Changes of Spike Propagation Fidelity During Postnatal Development in Cerebellar Purkinje Cells*

YANG Zhi-Lai^{1,2)}, WANG Jin-Hui^{1,2)**}

⁽¹⁾ State Key Laboratory for Brain and Cognitive Sciences, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The axons of cerebellar Purkinje cells are the sole output of the cerebellar cortex. So it is important to study the spike propagation on the axons of cerebellar Purkinje cells. The morphology and function of cerebellar Purkinje cells mature rapidly in two to three weeks after birth. And the ability to fire spikes increases along with the development in cerebellar Purkinje cells. Whether the capacity of spike propagation on the axons also increase remains elusive. We studied this hypothesis by double-patch recordings in cerebellar Purkinje cells at PND 8 (postnatal day) and 15. The spike propagation fidelity on the axons is higher at PND 15 than 8. Afterhyperpolarization (AHP) can increase spike propagation fidelity in cerebellar Purkinje cells at PND 8. Our data indicate that the ability to fire spikes and the capacity of spike propagation on the axons increase correspondingly along with the development.

Key words cerebellar Purkinje cell, spike, propagation, VGSC, axon

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00095

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program (2013CB531304, 2011CB504405) and The National Natural Science Foundation of China (30990261, 81171033).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888472, E-mail: jhw@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 15, 2013 Accepted: April 24, 2013